

PCT/JP00/01415

08.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/01415

REC'D 28 APR 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年10月 6日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第286034号

出 願 人

Applicant (s):

昭和産業株式会社

(4)

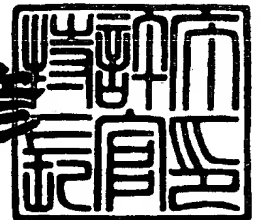
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3025911

【書類名】 特許願

【整理番号】 P199S02161

【提出日】 平成11年10月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

【氏名】 伏見 直也

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

【氏名】 水淵 裕之

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

【氏名】 井上 靖

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

【氏名】 岡本 勝之

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内

【氏名】 三吉 新介

【特許出願人】

【識別番号】 000187079

【氏名又は名称】 昭和産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100104673

【弁理士】

【氏名又は名称】 南條 博道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050740

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 微生物寄託書 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マンノースイソメラーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 の第 1 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 6 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 2 0 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 3 3 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 4 0 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 4 1 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 7 8 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 8 7 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 8 8 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 9 6 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 1 0 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 2 9 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 3 5 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 4 7 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 4 9 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 6 1 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、第 1 6 5 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列、および前記いずれかのアミノ酸配列において 1 または 2 以上のアミノ酸が置換され、欠失され、あるいは付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、会合してマンノースイソメラーゼ活性を発現するポリペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のいずれかのポリペプチドからなるマンノースイソメラーゼ。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の遺伝子を含有し、マンノースイソメラーゼを発現する、マンノースイソメラーゼ発現ベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の発現ベクターを有する組換え宿主。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の組換え宿主を培養する工程を含む、マンノースイソメラーゼの生産方法。

【請求項 7】 請求項 2 に記載のマンノースイソメラーゼとフラクトースとを反応させる工程を含む、マンノースの製造方法。

【請求項 8】 グルコースとグルコースイソメラーゼとを反応させる工程、および得られた反応生成物と請求項 2 に記載のマンノースイソメラーゼとを反応させる工程を含む、マンノースの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マンノースイソメラーゼを構成するポリペプチド、そのアミノ酸配列、その遺伝子配列、並びにこの遺伝子配列を用いるマンノースイソメラーゼの生産方法、並びにこのマンノースイソメラーゼを用いるマンノースの製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

マンノースは、医薬品合成の原料、マンニトールの原料として、又は、動物細胞培養の原料として有用である。さらに、マンノースを飼料に添加することにより、サルモネラ定着抑制が行われ、腸内サルモネラ菌の増殖を著しく抑制すると報告されており、家禽類の飼料としての利用が期待されている（Poultry Science 68巻、1357頁、1989）。

【0 0 0 3】

マンノースは、上記のように有用性が高いが、容易に入手するのは困難である。マンノースは、酵母、細菌、植物、および動物の細胞膜および細胞壁の構成成分として存在するほか、糖蛋白質の複合型糖鎖中に多量に含まれ、遊離型は稀にしか存在しないからである。

【0 0 0 4】

従来、マンノースは、マンノースを含有する多糖類（グルコマンナン、ガラクトマンナンなど）を酸分解あるいは酵素分解する、または、高温下で、モリブデン酸塩を触媒としてグルコースを処理することにより製造されている。しかし、いずれの方法においても製造コストが高く、収率も高くない。

【0 0 0 5】

そこで、原料として安価なフラクトースにマンノースイソメラーゼを作用させる方法、又はグルコースにグルコースイソメラーゼを作用させて、グルコースをフラクトースに変換させた後、フラクトースにマンノースイソメラーゼを作用させる方法が考えられている。

【0006】

しかし、微生物由来のマンノースイソメラーゼは耐熱性に劣る（最適温度が35～40℃）のに加え、フラクトースからマンノースへの変換効率は低く、工業的利用には適さないという欠点がある。他方、耐熱性の酵素であれば、雑菌の汚染が少なく、反応速度も速いと考えられるので、耐熱性のマンノースイソメラーゼが望まれている。このような耐熱性のマンノースイソメラーゼとしては、シュードモナス（*Pseudomonas*）属微生物由来のマンノースイソメラーゼが特開平6-292578号公報に、サーモモノスポラ（*Thermomonospora*）属微生物由来のマンノースイソメラーゼが特開平11-75836号公報に記載されている。これらの酵素は安定温度が比較的高いものの、実用化には不充分であり、さらに変換効率の高い、耐熱性のマンノースイソメラーゼが望まれている。このようなマンノースイソメラーゼが得られれば、これを遺伝子工学的に改変して、さらなるマンノースイソメラーゼが提供され、マンノースの製造が効率的に行われる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、耐熱性と変換効率に優れたマンノースイソメラーゼおよびその改変体を遺伝子工学的に提供することを目的とする。それによって、本発明は、優れたマンノースの製造方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、配列番号2の第1～434番目のアミノ酸配列、第16～434番目のアミノ酸配列、第20～434番目のアミノ酸配列、第33～434番目のアミノ酸配列、第40～434番目のアミノ酸配列、第41～434番目のアミノ酸配列、第78～434番目のアミノ酸配列、第87～434番目のアミノ酸配列、第88～434番目のアミノ酸配列、第96～434番目のアミノ酸配列、第110～434番目のアミノ酸配列、第129～434番目のアミノ酸配列、第135～434番目のアミノ酸配列、第147～434番目のアミノ酸配列、第149～434番目のアミノ酸配列、第161～434番目のアミノ酸配列、第165～434番目のアミノ酸配列、および前記各アミノ酸配列において1

または2以上のアミノ酸が置換され、欠失され、あるいは付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、会合してマンノースイソメラーゼ活性を発現するポリペプチドに関する。

【0009】

また、本発明は、前記いずれかのポリペプチドを有するマンノースイソメラーゼに関する。

【0010】

さらに、本発明は、前記いずれかのポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子に関する。

【0011】

また、本発明は、前記いずれかのポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を含み、マンノースイソメラーゼを発現する、マンノースイソメラーゼ発現ベクターに関する。

【0012】

さらに、本発明は、前記発現ベクターを有する組換え宿主に関する。

【0013】

また、本発明は、前記組換え宿主を培養する工程を含む、マンノースイソメラーゼの生産方法に関する。

【0014】

また、本発明は、前記ポリペプチドからなるマンノースイソメラーゼとフラクトースとを反応させる工程を含む、マンノースの製造方法に関する。

【0015】

そして、本発明は、グルコースとグルコースイソメラーゼとを反応させる工程、および得られた反応生成物と前記ポリペプチドからなるマンノースイソメラーゼとを反応させる工程を含む、マンノースの製造方法に関する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明は、配列番号2の第1～434番目のアミノ酸配列、第16～434番目のアミノ酸配列、第20～434番目のアミノ酸配列、第33～434番目の

アミノ酸配列、第 40～434 番目のアミノ酸配列、第 41～434 番目のアミノ酸配列、第 78～434 番目のアミノ酸配列、第 87～434 番目のアミノ酸配列、第 88～434 番目のアミノ酸配列、第 96～434 番目のアミノ酸配列、第 110～434 番目のアミノ酸配列、第 129～434 番目のアミノ酸配列、第 135～434 番目のアミノ酸配列、第 147～434 番目のアミノ酸配列、第 149～434 番目のアミノ酸配列、第 161～434 番目のアミノ酸配列、第 165～434 番目のアミノ酸配列、および前記各アミノ酸配列において 1 または 2 以上のアミノ酸が置換され、欠失され、あるいは付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、会合してマンノースイソメラーゼ活性を発現するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドということがある）に関する。

【0017】

本発明のポリペプチドは、アグロバクテリウム・ラディオバクター (*Agrobacterium radiobacter*) M36 と同定された菌株から得られる DNA、およびその DNA の改変 DNA から生産される。このアグロバクテリウム・ラディオバクターの M36 は、広島県の土壌から単離され、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに FERM P-17377 として寄託されている。

【0018】

この微生物により生産される新規な耐熱性のマンノースイソメラーゼは、以下の性質：

(1) 作用

フラクトースとマンノースとを相互変換する。

(2) 基質特異性

D-マンノースおよび D-フラクトースに作用し、D-グルコース、L-アラビノース、D-キシロース、および L-ラムノースには作用しない。

(3) 最適温度

55～60℃

(4) 最適 pH

7～9

(5) 安定温度

60℃まで

(6) 安定 pH

5.5～10

(7) 分子量

約140,000 (ゲル濾過HPLC)

(8) 等電点: 5.2 (等電点電気泳動)

を有している。

【0019】

このマンノースイソメラーゼは、配列番号1のDNA配列から推定すると、配列番号2の第20～434番目のアミノ酸(415個)配列を有するポリペプチドが会合していると考えられる。このアミノ酸配列に相当するDNA配列は、配列番号1の第314～1558番目の配列である。

【0020】

配列番号1に記載の染色体DNAは、以下のようにして得られる。まず、アグロバクテリウム・ラディオバクターM36株を培養し、細胞壁溶解酵素、超音波処理などを用いて菌体を破壊し、常法により染色体DNAを抽出する。そして、いわゆるショットガンクローニングする。あるいは、アグロバクテリウム・ラディオバクターM36株を培養し、マンノースイソメラーゼを単離、精製して、そのアミノ酸配列の一部を決定し、そのDNA配列を合成し、これをプローブとして染色体DNAから単離するか、あるいは、アミノ酸配列の一部のDNA配列をプライマーとしてPCR法を用いてDNAを増幅する、またはこれらの方法を組合せて得られる。また、配列決定後、DNAを化学合成してもよい。

【0021】

ショットガンクローニングは、当業者に周知の方法であり、例えば、前記得られた染色体DNAをSau3AIのような4塩基認識の制限酵素で部分加水分解し、適切な大きさ(例えば5～10kbp)のDNA断片を回収する。回収したDNA断片を、適切な発現ベクターまたはプラスミド(例えば、pBluescr

i p t II SK (+)) を B a m H I、H i n d I I Iなどの適切な制限酵素切断部位に導入して大腸菌を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシドおよびイソプロピル1-チオ- β -D-ガラクトシドを含む寒天培地で培養し、白色コロニーを選択する。得られた白色コロニーを、例えば、0.3%フラクトースと2.5 mg/ml リゾチームを含むグルコース C I I -テストキットに懸濁して、37℃で一晩静置し、顕著な発色があったコロニーを選別する。

【0022】

得られた形質転換株がマンノースイソメラーゼを発現しているか否かは、マンノースイソメラーゼの活性を測定することにより、確認される。例えば、イソプロピル1-チオ- β -D-ガラクトシドを250 μ g/ml、アンピシリンを100 μ g/ml 含有するLB培地で形質転換株を植菌し、37℃で適切な時間培養する；培養後、遠心分離により菌体を回収し、洗浄後、適切な緩衝液に懸濁して超音波破碎を行う；超音波破碎液を遠心分離して上清を得、これを粗酵素液とする；ついで、この粗酵素液と20%フラクトース溶液とを、例えば、50℃で24時間反応させ、HPLCでマンノースの生成を確認する；という方法である。

【0023】

上記の方法により、マンノースイソメラーゼ活性を発現する形質転換体を得られる。この形質転換体からDNA配列を回収することにより、マンノースイソメラーゼ活性を発現するポリペプチドをコードするDNA配列（例えば、配列番号1の配列）が得られる。

【0024】

いったんマンノースイソメラーゼのポリペプチドをコードするDNA配列が得られると、DNA配列が改変され、マンノースイソメラーゼ活性を発現する改変ポリペプチドが得られる。

【0025】

アミノ酸配列の1または2以上の置換、欠失、付加などを有する改変ポリペプチドは、当業者に周知の、例えば、部位特異的突然変異、部位特異的変異誘発、

部位特異的組換えなどの方法でDNA配列を改変して得られる。例えば、アミノ酸配列の1または2以上の置換、欠失、付加などを有する短いDNA配列をプライマーとして用い、配列番号1の配列をテンプレートとして、PCRを行うことにより、容易に改変ポリペプチドをコードするDNA配列が得られる。例えば、配列番号3、4は、N末端にアミノ酸が付加されたポリペプチド、および配列番号6～19はN末端のアミノ酸が欠失したポリペプチドを得る場合のプライマーの例である。

【0026】

得られたDNA配列を発現ベクターに組み込み、例えば、上述のショットガンクローニングと同じスクリーニング系でマンノースイソメラーゼ活性をスクリーニングすることにより、アミノ酸配列の1または2以上の置換、欠失、付加された、マンノースイソメラーゼ活性を発現するポリペプチドをコードするDNA配列が得られる。

【0027】

得られたDNA（以下、本発明のDNAということがある）は、発現ベクターに導入され、マンノースイソメラーゼ発現ベクターが作成される。通常、プロモーターの下流の適切な部位にクローニング部位を有するプラスミドが使用され、このプロモーターによって、本発明のポリペプチドが発現され、マンノースイソメラーゼが発現される。

【0028】

本発明の発現ベクターの作成に用いられるプラスミドあるいはベクターとしては、自律複製可能なベクターが好ましく、導入する宿主を考慮して適切な発現ベクターを選択すればよい。大腸菌を宿主とする場合は、例えば、pBR322、pBluescript II SK (+)、pUC18、pKK223-3、pCR2.1が好適であり、枯草菌を宿主とする場合は、pHY300PLK、pUB110などが好適である。その他のベクターとして、pLex、pJL3、pSW1、pSE280、pSE420などのプラスミドベクター、 λ gt11、 λ ZAPなどのファージベクターが挙げられる。

【0029】

プラスミドあるいはベクターは、適切な制限酵素切断部位、例えば、BamHI、HindIII、EcoRI切断部位等をクローニングサイトとして有していることが好ましく、マルチクローニングサイトであることがさらに好ましい。このクローニングサイトに適合する制限酵素で切断したDNA断片を導入することにより、容易に発現ベクターが構築される。

【0030】

発現ベクターは、マンノースイソメラーゼを分泌するように設計してもよい。分泌のために、予め宿主のリーダーペプチドをコードする配列と本発明のポリペプチドをコードする配列とをインフレームで結合させておくか、プロモーターにリーダー配列を結合させておき、そのリーダー配列に本発明のポリペプチドをコードする配列を直結させることにより、本発明のポリペプチドを分泌させることができる。リーダーペプチド配列と本発明のポリペプチドの結合は、例えば、部位特異的突然変異などの、当業者に周知の方法で行われる。

【0031】

得られた発現ベクターは、当業者に周知の方法で宿主に導入される。宿主としては、大腸菌、枯草菌、放線菌などの原核細胞、酵母、糸状菌などの真核細胞、動物細胞、植物細胞などが挙げられる。導入方法は、当業者が通常用いる方法、例えば、形質転換、形質導入、エレクトロポレーション、細胞融合などが用いられる。

【0032】

得られた組換え宿主は、ついで、培養され、本発明のポリペプチドが生産され、会合してマンノースイソメラーゼ活性を発現する。リーダーペプチド配列を用いた場合、ポリペプチドが菌体外（ペリプラズムを含む）に分泌され、会合してマンノースイソメラーゼ活性が生じる。

【0033】

マンノースイソメラーゼは、菌体内あるいはペリプラズムに存在する場合は、菌体を細胞壁溶解酵素処理、超音波処理などにより溶菌して回収し、菌体外に分泌された場合は、培養液より回収される。回収されたマンノースイソメラーゼはそのまま、あるいは常法により精製して、マンノースの製造に用いられる。

【 0 0 3 4 】

マンノースイソメラーゼが菌体内あるいはペリプラズムに存在する場合は、細胞を固定化して、固定化酵素として用いてもよい。

【 0 0 3 5 】

マンノースイソメラーゼを用いるマンノースの製造方法には、2通りある。一つは、本発明のポリペプチドとフラクトースとを反応させる方法であり、他の一つは、グルコースとグルコースイソメラーゼとを反応させた反応生成物に本発明のポリペプチドを反応させる方法である。

【 0 0 3 6 】

フラクトースからマンノースを製造する場合は、フラクトースを含有する溶液と本発明のポリペプチドからなるマンノースイソメラーゼとを、適切なpH条件および温度条件下で反応させればよい。アミノ酸の置換、欠失、付加を有する改変されたポリペプチドからなるマンノースイソメラーゼは、最適温度、最適pHが改変前のマンノースイソメラーゼと異なる可能性もあるので、使用前に確認しておけばよい。一般的には、pHが5.5～10、温度が65℃以下で行うことが好ましい。

【 0 0 3 7 】

グルコースからマンノースを製造する場合、まず、グルコースとグルコースイソメラーゼとの反応を行い、反応生成物を単離して、この反応生成物とマンノースイソメラーゼとを反応させてもよい。あるいは、グルコースと、グルコースイソメラーゼと、マンノースイソメラーゼとを同時に混合して反応させてもよい。この場合、グルコースイソメラーゼは、マンノースイソメラーゼと最適pHおよび最適温度に近いものを選択することが必要となる。前記2つの方法は、酵素（必要に応じて微生物自体）を固定化して連続的に行うこともできる。

【 0 0 3 8 】

反応終了後、例えば、濾過、遠心分離などにより不純物を取り除いた後、活性炭、イオン交換クロマトグラフィー、膜濾過、濃縮などの、当業者が適宜用いる分離、精製プロセスを経て、マンノースが精製される。

【 0 0 3 9 】

【実施例】

以下、本発明を、実施例を挙げて説明するが、本発明はこの実施例にのみ限定されるものではない。なお、本実施例で%というときは重量%を意味する。

【0040】

(実施例 1 : マンノースイソメラーゼ遺伝子の取得)

(染色体 DNA の調製)

LB 液体培地 (ポリペプトン 1 %、酵母エキス 0. 5 %、塩化ナトリウム 0. 5 % (pH 7. 0)) 5 ml にアグロバクテリウム・ラディオバクター M36 株 (FERM P-17377) を植菌し、30℃、16 時間振盪培養した。これを、100 ml の LB 培地を含む 500 ml のバッフル付きフラスコに移し、30℃、24 時間培養し、遠心分離により菌体を回収した。

【0041】

回収した菌体を 0. 1 M の EDTA を含む 0. 1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8. 0) に懸濁した。この懸濁液にリゾチーム (和光純薬 (株)) を 4 mg/ml となるように加え、37℃、30 分間、穏やかに振盪した後、-80℃で 30 分間凍結乾燥した。解凍後、1 % SDS と 10 mM の EDTA を含む 0. 1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9. 0) を加え、さらにプロテアーゼ K (宝酒造 (株)) を 0. 5 mg/ml となるように加えて、37℃で 6 時間保温した。この処理液に 1 mM の EDTA を含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8. 0) (以下、TE 緩衝液という) で飽和したフェノール溶液を加えて除蛋白処理を行い、上清を得た。上清に冷エタノールを加えて生成した染色体 DNA の沈殿を回収し、これを 70 % エタノールに 5 分間浸した後、TE 緩衝液に溶解した。この溶解液に RNase A (シグマ (株)) を 10 μg/ml となるように加え、37℃、2 時間反応させた。反応液にフェノールを加えて再度、除蛋白処理を行い、冷エタノールを加えて生成した染色体 DNA の沈殿を回収した。得られた精製染色体 DNA を 70 % エタノールに 5 分間浸した後、2 mg/ml となるように TE 緩衝液に溶解し、染色体 DNA 溶液とした。

【0042】

(ショットガンスクリーニング : マンノースイソメラーゼを発現する形質転換

体の選択)

染色体DNA溶液の1mlをとり、これに制限酵素Sau3AIを約40単位加えて37℃、1時間反応させて染色体DNAの部分加水分解物を得、アガロースゲル電気泳動法により、約5~10kbpのDNA断片を回収した。

【0043】

別途、プラスミドベクターpBluescript II SK (+)を制限酵素BamHIで切断し、その0.1μgと回収したDNA断片1μgをDNALigation Kit (宝酒造 (株)) で連結し、組換えプラスミドを得た。これをコンピテントセル (Competent high E. coli JM109 (東洋紡績 (株))) 100μlに加え、氷冷下で30分間静置した後、42℃に加温し、SOC培地 (2%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキス、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、20mM グルコース、pH 7.5) を加えて37℃、1時間、インキュベートし、組換えプラスミドを大腸菌に導入した。

【0044】

アンピシリン100μg/mlを含有するLB培地で形質転換株を選択した。形質転換株を、50μg/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシドおよび250μg/mlのイソプロピル1-チオ-β-D-ガラクトシドを含むLB寒天培地 (pH 7.0) で37℃、18時間培養し、白色コロニーを選択した。得られた白色コロニーを、0.3%フラクトースと2.5mg/ml リゾチームを含むグルコースCII-テストワコー (和光純薬 (株)) に懸濁して、37℃で一晩静置し、目視で顕著な赤色の発色があったコロニーを選別した。

【0045】

得られた形質転換株がマンノースイソメラーゼを発現しているか否かを以下のようにして確認した。イソプロピル1-チオ-β-D-ガラクトシドを250μg/ml、アンピシリンを100μg/ml含有するLB培地に形質転換株を植菌し、37℃で24時間培養した。培養終了後、遠心分離により菌体を回収し、25mlの100mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) で2回洗浄した。10mlの

同じリン酸緩衝液に菌体を懸濁して超音波破碎を行い、遠心分離して上清を得、これを粗酵素液とした。この粗酵素液と20%フラクトース溶液とを、50℃で24時間反応させ、HPLCでマンノースの生成を確認した。HPLCの条件は以下の通りである。

ポンプ機種：日本分光（株）製 PU-1580

カラム：資生堂（株）製 CAPCELL PAK NH2 UG80

検出器：昭和電工（株）製 RI-71型示差屈折計

溶離液：アセトニトリル：水=80：20

流速：1.0 ml/min

【0046】

HPLCの結果を図1に示す。図中、Fruはフラクトースを、Manはマンノースをそれぞれ表す。この形質転換株は、フラクトースからマンノースを生成すること、すなわちマンノースイソメラーゼ活性を有していることが確認され、1-42-8株と命名した。

【0047】

（推定マンノースイソメラーゼ遺伝子の取得と配列決定）

得られた形質転換体1-42-8株を、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地に植菌し、37℃、24時間培養した。遠心分離により菌体を採取し、アルカリ法により組換えプラスミドを菌体外に溶出させ、常法により精製し、分析したところ、組換えプラスミドは約10 kbpであり、約7 kbpのDNA断片が導入されていた。この組換えプラスミドをpMI1428と命名した。組換えプラスミドpMI1428の制限酵素切断地図を図2に示す。図2においてMIは、マンノースイソメラーゼを表す。

【0048】

組換えプラスミド（pMI1428）をPCRで増幅し、配列を決定した。PCRに用いた5'プライマーは配列番号20の5'-gccaaagcgcgcaattaaccc-3'（Bluescript MCS5'）であり、3'プライマーは配列番号21の5'-catgctcgagctattggccgcagagcgcct-3'である。pMI1428を1 µg取り、これに前記プライマー0.02 µgとビッグダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・

エフエス・レディー・リアクションキット（パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ（株））のプレミックス液 $8 \mu\text{l}$ をそれぞれ加えた後、さらに適量の水を加えて全量を $20 \mu\text{l}$ とした。この混合液をタカラ・サーマルサイクラー・MP型により 94°C で 10 秒間、 50°C で 5 秒間、さらに 60°C で 4 分間反応を行った。これを 25 回繰り返して、相補鎖 DNA を含む反応物を得た。その後、セントリセップ・スピнкаラム（パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ（株））を用いて反応物を精製し、真空乾燥した。得られた粉状物にテンプレート・サプレッション・リエージェント（パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ（株））を $20 \mu\text{l}$ 加えてよく混合し、 95°C で 2 分間加熱後、急冷したものをシーケンシングサンプルとした。これを ABI PRISM 310 ジェネティックアナライザー（パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ（株））を用いて解析した。

【0049】

得られた約 7.0 kbp の配列データを解析し、蛋白質をコードする配列を含有する約 1.5 kbp の断片を取得した。この 1.5 kbp 断片の DNA 配列は、配列番号 1 に示されている。この配列番号 1 の第 314～316 番目の atg が開始コドン、そして、第 1559～1561 番目の taa が終止コドンと考えられる。従って、第 314～1558 番目がマンノースイソメラーゼの構造遺伝子であり、配列番号 2 のアミノ酸配列を有していると推定される。そして、配列番号 1 の第 313 番目まではプロモーター領域と推定される。

【0050】

（マンノースイソメラーゼ遺伝子の発現の確認）

配列番号 1 の第 314～316 番目の atg から始まるアミノ酸配列をコードする配列番号 22 (5'-aaaggatcccatgcccgaagacgatcaca-3') の配列を 5'-プライマーとし、配列番号 1 の第 1559～1561 番目の終止コドンを含む配列番号 19 (C1: 5'-aaaaagcttttaataatccccgccgcttt-3') の配列を 3'-プライマーとして、pMI1428 をテンプレートにして、上記と同様の条件で PCR を行った。反応後 DNA を回収し、制限酵素 BamHI で切断した。

【0051】

このDNA 0.1 μ gと、予め制限酵素BamHIおよびHindIIIで切断したプラスミドベクターpBluescript II SK (+) の0.1 μ gとをDNA Ligation Kit (宝酒造(株)) で連結し、組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドは、 β -ガラクトシダーゼのN末端の33アミノ酸がN末端に融合したマンノースイソメラーゼを発現する。

【0052】

組換えプラスミドを上記のショットガンクローニングと同様の方法で大腸菌に導入し、得られた形質転換株をグルコースCII-テストワコー(和光純薬(株))に懸濁して、37℃で一晩静置し、目視で顕著な発色があったコロニーを選別し、マンノースイソメラーゼを生産することをHPLCで確認して、形質転換株を取得した。この結果、配列番号1の第314~1558番目のDNA配列(すなわち、配列番号2の第20~434番目のアミノ酸配列)が、マンノースイソメラーゼ構造遺伝子であると推定された。

【0053】

(実施例2:マンノースイソメラーゼのアミノ酸欠失、付加改変体の作成と活性発現)

以下のN1~16(配列番号3~18)を5'-プライマーとし、C1(配列番号19)を3'-プライマーとして用いて、マンノースイソメラーゼ改変体を得た。

N1: 5'-aaatctagatgacaggtttatacggcaa-3' (配列番号3)

N2: 5'-aaatctagatggaggacgcaatgcccga-3' (配列番号4)

N3: 5'-aaatctagatgcccgaagacgatcacia-3' (配列番号5)

N4: 5'-aaatctagatgctgccctggcaccgccagt-3' (配列番号6)

N5: 5'-aaatctagatgctggtgaaacaggccgaggg-3' (配列番号7)

N6: 5'-aaatctagatggtgaaacaggccgagggact-3' (配列番号8)

N7: 5'-aaatctagatggtgcgcggcatccatgcctc-3' (配列番号9)

N8: 5'-aaatctagatggtgcattgcttctccat-3' (配列番号10)

N9: 5'-aaatctagatgctgctcggccggcgggctg-3' (配列番号11)

N10: 5'-aaatctagatgacctatctctggaacia-3' (配列番号12)

N 1 1 : 5'-aaatctagatggtgaacgatgccggcccagt-3' (配列番号 1 3)
 N 1 2 : 5'-aaatctagatggtggacgccaccaagcaggg-3' (配列番号 1 4)
 N 1 3 : 5'-aaatctagatggtgcttctggccgcctcttc-3' (配列番号 1 5)
 N 1 4 : 5'-aaatctagatgctggccgcctcttccgcaa-3' (配列番号 1 6)
 N 1 5 : 5'-aaatctagatgctggccgaccggatgctggc-3' (配列番号 1 7)
 N 1 6 : 5'-aaatctagatgctggctgatattaccga-3' (配列番号 1 8)
 C 1 : 5'-aaaaagcttttaataatccccgccgcttt-3' (配列番号 1 9)

【0054】

N 1 ~ N 1 6 と C 1 とを組み合わせて、実施例 1 で得た染色体 DNA をテンプレートとして PCR を行った。PCR キットは、T a K a R A E x T a q (宝酒造 (株)) である。PCR 反応条件は、93℃で 2 分、95℃で 1 分、55℃で 1 分 30 秒、72℃で 3 分のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 72℃で 15 分間保温した。それぞれの反応液に冷エタノールを加えて DNA を沈殿させ、回収した。

【0055】

プライマー N 1 (配列番号 3) と C 1 (配列番号 1 9) を用いて PCR を行い、発現ベクター p N 1 C 1 を作成する例を、図 3 で説明する。アグロバクテリウム・ラディオバクター M 3 6 株の染色体 DNA (1.5 k b p 断片) をテンプレートとし、N 1 と C 1 とをプライマーとして PCR 産物を得た。この PCR 産物を、まず制限酵素 X b a I で切断し、ついで S 1 ヌクレアーゼを用いて末端を平滑化した後、制限酵素 H i n d I I I で消化した。

【0056】

他方で、市販のベクター p T r c 9 9 A (ファルマシア製) を、まず N c o I で切断し、S 1 ヌクレアーゼで平滑末端化し、ついで、H i n d I I I で切断した。この H i n d I I I 部位を有するプラスミドに、上記得られた PCR 産物の H i n d I I I 断片を組み込み、発現ベクター p N 1 C 1 を作成した。

【0057】

同様の操作を N 2 ~ N 1 6 と C 1 のプライマーを組合せて用いて、それぞれの発現ベクターを作成した。これらの各発現ベクターからは、末端にメチオニンを

有するポリペプチドが生じる。これらの発現ベクターを、それぞれ、前記と同様の方法でコンピテントセル *E. coli* JM109（宝酒造（株））に導入し、形質転換体を得た。

【0058】

得られたそれぞれの形質転換大腸菌は、前記グルコース C I I -テストワコー（和光純薬（株））に懸濁して、37℃で一晩静置すると顕著な発色があり、HPLCでマンノースを生産していることが確認された。表1に用いたプライマー、生じる発現ベクターおよびその発現ベクターで形質転換された大腸菌の命名、およびマンノースイソメラーゼの活性の有無、および生じるポリペプチドを一覧表にして示す。表1のポリペプチドの欄において、数字は配列番号2の配列のアミノ酸の番号を示し、Met+はその欄のポリペプチドのN末端にメチオニンが付加されていることを示す。なお、プラスミドを含有しない *E. coli* JM109は、マンノースイソメラーゼの活性を発現しなかった。

【0059】

【表1】

| PCRに使用した プライマー | 発現ベクター | 形質転換 大腸菌 | 活性 | ポリペプチド |
|-------------------|--------|-------------|----|-------------|
| N1, C1 | pN1C1 | N1C1 | + | 1~434 |
| N2, C1 | pN2C1 | N2C1 | + | 16~434 |
| N3, C1 | pN3C1 | N3C1 | + | 20~434 |
| N4, C1 | pN4C1 | N4C1 | + | Met+33~434 |
| N5, C1 | pN5C1 | N5C1 | + | Met+40~434 |
| N6, C1 | pN6C1 | N6C1 | + | Met+41~434 |
| N7, C1 | pN7C1 | N7C1 | + | Met+78~434 |
| N8, C1 | pN8C1 | N8C1 | + | 87~434 |
| N9, C1 | pN9C1 | N9C1 | + | Met+96~434 |
| N10, C1 | pN10C1 | N10C1 | + | 110~434 |
| N11, C1 | pN11C1 | N11C1 | + | Met+129~434 |
| N12, C1 | pN12C1 | N12C1 | + | Met+135~434 |
| N13, C1 | pN13C1 | N13C1 | + | Met+147~434 |
| N14, C1 | pN14C1 | N14C1 | + | Met+149~434 |
| N15, C1 | pN15C1 | N15C1 | + | Met+161~434 |
| N16, C1 | pN16C1 | N16C1 | + | 165~434 |

注) +はマンノースイソメラーゼ活性が発現したことを示す

【0060】

以上から、配列表の配列番号2の、第20～434番目のアミノ酸配列が天然のマンノースイソメラーゼのポリペプチドと考えられるが、このN末端にアミノ酸を19個付加した場合、および145個のアミノ酸をN末端から欠失させた場合、いずれもマンノースイソメラーゼ活性が発現した。従って、少なくとも第165～434番目のアミノ酸配列があれば、マンノースイソメラーゼ活性は認められる。

【0061】

(実施例3：マンノースイソメラーゼの点突然変異体の作成)

点突然変異は、配列番号2の第208番目のロイシンをバリンに変化させることにより行った。点突然変異は、Mutagen-Express Kmキット（宝酒造（株））（以下、単に「変異キット」という）を用い、製造者の取扱説明書に従って行った。

【0062】

図4～7に基づいて、点突然変異体の作成を順に説明する。実施例2（図3）で得られた組換えDNA（発現ベクターpN1C1）の5 μ gを、図4に示すように、制限酵素Pst IおよびHind IIIで切断した後、アガロースゲル電気泳動法により、約1.1 kbpのPst I-Hind III DNA断片を回収した。他方、変異キット中のプラスミドpKF18kを、制限酵素Pst IおよびHind IIIで切断し、その0.1 μ gと、前記1.1 kbpのDNA断片1 μ gとをDNA Ligation Kit（宝酒造（株））を用いて連結し、組換えプラスミドを得た。得られた組換えプラスミドをコンピテントセル（Competent high E. coli JM109（東洋紡績（株））100 μ lに加え、氷冷下で30分間静置した後、42℃に加温し、SOC培地を加えて37℃、1時間、インキュベートし、組換えプラスミドをE. coli JM109に導入した。ついで、カナマイシン100 μ g/mlを含有するLB寒天培地で37℃、18時間培養し、形質転換株を選択した。得られた形質転換株を、カナマイシン100 μ g/mlを含有するLB液体培地で37℃、18時間培養し、菌体を遠心分離にて回収後、アルカリ法にて組換えDNAを溶出させ、精

製した。得られた組換えプラスミドを pKFN1C1 と命名した。

【0063】

この pKFN1C1 は、カナマイシン耐性遺伝子 (Km) にアンバー変異 (am2) を有しており、pKFN1C1 を導入されたサプレッサー+の E. coli は、カナマイシン耐性となるが、pKFN1C1 を導入されたサプレッサー-の E. coli は、カナマイシン感受性となる。

【0064】

つぎに、変異導入プライマー 5' -cttcggtgac gtgcatatt-3' (配列番号 23:5' 末端がリン酸化されている) を用いて、点突然変異の導入を行った。図5にその模式図を示す。図5に基づいて説明すると、まず、この変異導入プライマー 50 pmol と変異キット中の選択プライマー 5 pmol とを 0.1 μg の pKFN1C1 に加え、100℃で3分間、熱変性させ、ついで氷中で5分間静置してアニーリングを行った。

【0065】

なお、選択プライマーは、カナマイシン耐性遺伝子のアンバー変異を修復させる配列を有しており、変異導入プライマーとともに pKFN1C1 とアニールし、相補鎖を合成したときには、変異導入プライマー配列と選択プライマー配列とが同一DNA鎖中になるように設計されている。

【0066】

このアニールしたDNAに、DNAリガーゼ60単位とDNAポリメラーゼ1単位とを加え、25℃、2時間、組換えプラスミドの複製を行った。この操作により、図5(3)に示すような、変異導入プライマーの配列と選択プライマーの配列とを同時に有する配列と pKFN1C1 の配列のヘテロな二本鎖構造を有する組換えプラスミドが得られる。

【0067】

この得られた組換えプラスミドを、am2 サプレッサー遺伝子を有する (サプレッサー+の) E. coli BMH71-18mut S コンピテントセル (宝酒造 (株)) 100 μl に加えて、氷冷下、30分静置した後、42℃に加温し、SOC 培地を加えて 37℃、1時間、インキュベートした。ついで、カナマイ

シン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する LB 培地で 37°C 、18 時間培養し、生育してきた形質転換株を集め、常法により DNA を精製した。

【0068】

得られた DNA は、図 6 の (4) に示すような、点突然変異を有さず、かつ、カナマイシン遺伝子にアンバー変異を有するプラスミド（すなわち、pKFN1C1）と、点突然変異を有し、かつ am2 変異が回復された（野生型の）カナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミド pKFN1C1LV が主として含まれている DNA 混合物と考えられる。

【0069】

このプラスミド pKFN1C1 とプラスミド pKFN1C1LV との混合物を *E. coli* MV1184 コンピテントセル（宝酒造（株）） $100 \mu\text{l}$ に加えて、氷冷下、30 分静置した後、 42°C に加温し、SOC 培地を加えて 37°C 、1 時間、インキュベートした。ついで、カナマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する LB 寒天培地で 37°C 、18 時間培養し、生育してきた形質転換株を取得した。この *E. coli* MV1184 株はサプレッサーであるので、プラスミド pKFN1C1 で形質転換された株は生育できないため、得られた形質転換株はプラスミド pKFN1C1LV を有する株である。

【0070】

形質転換株を集め、DNA を精製して、Pst I-Hind III 断片を回収し、変異導入プライマーと C1 プライマーを用いて PCR を行い、実施例 1 に準じて DNA 配列を決定した。プラスミド pKFN1C1LV は、図 6 (5) に示されるようなプラスミドであり、マンノースイソメラーゼ遺伝子部分には所望の変異以外に変異が導入されていないことが確認された。

【0071】

ついで、目的の点突然変異が導入されたマンノースイソメラーゼを発現すプラスミドを構築した。図 7 にその模式図を示す。プラスミド pKFN1C1LV を Pst I と Hind III で切断し、点突然変異を有する Pst I-Hind III の DNA 断片を単離した。他方で、pN1C1 を Pst I と Hind III で切断し、高分子量のベクター DNA 断片を取得した。 $1 \mu\text{g}$ の単離した点突然変異を有

する Pst I-Hind III の DNA 断片と、0.1 μ g の pN1C1 のベクター-DNA 断片とを DNA Ligation Kit (宝酒造 (株)) を用いて連結し、組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドをコンピテントセル (Competent high E. coli JM109 (東洋紡績 (株))) 100 μ l に加え、氷冷下で 30 分間静置した後、42℃ に加温し、SOC 培地を加えて 37℃、1 時間、インキュベートして、E. coli JM109 に導入した。ついで、アンピシリン 100 μ g/ml を含有する LB 寒天培地で 37℃、18 時間培養し、形質転換株を選択した。得られた形質転換株を、アンピシリン 100 μ g/ml を含有する LB 液体培地で 37℃、18 時間培養し、菌体を遠心分離にて回収後、アルカリ法にて組換え DNA を溶出させ、精製し、図 7 に示す構造であることを確認した。得られた組換えプラスミドを pN1C1LV と命名した。

【0072】

このようにして得られた形質転換体のマンノースイソメラーゼ活性を、実施例 1 と同様にして測定した結果を表 2 に示す。

【0073】

【表 2】

| 形質転換体 | 相対活性(%) |
|---------------|---------|
| JM109/pN1C1 | 100 |
| JM109/pN1C1LV | 97.2 |
| JM109 | 0 |

【0074】

表 2 に記載のように、変異型マンノースイソメラーゼ活性は野生型マンノースイソメラーゼとほぼ同等の活性を有していた。

【0075】

【発明の効果】

本発明のマンノースイソメラーゼのポリペプチドは、耐熱性に優れている。このポリペプチドの遺伝子配列を提供することにより、種々のマンノースイソメラ

一ゼ改変体が、安価に、大量に得られるため、マンノースが安価に生産される。

【 0 0 7 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Showa Sangyo Co., Ltd.

<120> mannose isomerase gene

<130> P199S02161

<160> 23

<210> 1

<211> 1581

<212> DNA

<213> Agrobacterium radiobacter M36

---<400> 1

| | |
|--|-----|
| gatctgcgtg cccatggcac cgtcgagaat gaggatgcgt tcgctggcag cctcgcgcag | 60 |
| cgcccttgaaa atttccgcgc cgtcgcgcctt tgcccccttca gggccaaaca gatcgtcaaa | 120 |
| cacgggcaca ctctcattt cgatttgcaa gatcgcaagt cgtcaagtca cataaagata | 180 |
| tgtttatgtc aatatactt caaggacag gcatggcttt gcgtcgttgc gtcacgttac | 240 |
| gaaatatcgc tgacagatga caggtttata cggcaaggat ataagccgaa gcagcaaacg | 300 |
| catggaggac gcaatgcccg aagacgatca caacagccgc aactggaata ccctgccctg | 360 |
| gcaccgccag tggctgggtga aacaggccga gggacttttc gacttcttcc agtatcgcgc | 420 |
| cctcaatccc gccggcggtt tcttcgatct cgacgccaaag ggcgcgccgc tgcaggcaaa | 480 |
| cgatcccgtg cgcggcatcc atgcctctgc gcgcatggtg cattgcttct ccatcggcc | 540 |
| cctgctcggc cggccgggct gcggcgatat cgtcgaccac ggcatgacct atctctggaa | 600 |
| caaacaccgc gatggcgaac atggcggtta tttctggcag gtgaacgatg ccggcccagt | 660 |
| ggacgccacc aagcagggtt atggccacgc ctctgtgctt ctggccgcct cttccgcca | 720 |
| gaccgtcggc caccgctgg ccgaccgat gctggctgat attaccgaag tgctggaaag | 780 |
| tcgtttctgg gaagaaaaac atggcgccat cgccgaggaa ttcaatcgcg actggctgcc | 840 |
| catcgacaat tatcgcggcc agaactcaa tatgcacctc accgaagcgc tgatggccgc | 900 |
| ctatgaggtg accggcgaca ataactatct cagcaaggcc gaacgcatcg ccgatctcgt | 960 |

catccgtcgc cgcgccggcg agctggattt ccgcgtgccc gagcatttcg acgacaactg 1020
gacgtctggac aaggactatc gcggcaacga aatgttccgc ccctccggct ccacccccgg 1080
ccactggctg gaatggggcg gtctcatcct gcaattgtgg atactgggcg aacgccgcca 1140
cgactggatg ccggtcgcgg ccaaatccct cticgtgcag tccatggcgc tgggctggga 1200
ccgggaaaag ggcggcttct ttatagct ggactggaat gacaatcccg acaagcgggc 1260
aaagctctgg tggcccatgt ccgaggcggc ggggtgcggc catttcctca acgagaacct 1320
gccggcggat ggcttctacg aagacagcta tcgtcgcata tggagcacca tcgccaacaa 1380
cttcatcgac catgccaatg gcggctggca tgaggaactg acggaagatc tggttcccgc 1440
ccacacgcta ttcccaggca agggcgatat ctaccatgcg ctccaggcct gcctcatccc 1500
gcttttcccg gcgacgggca gcctgacgaa ggtgatcaag gaaagcggcg gggattatta 1560
aggcgctctg cggccaatag c 1581

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> Agrobacterium radiobacter M36

<400> 2

Met Thr Gly Leu Tyr Gly Lys Asp Ile Ser Arg Ser Ser Lys Arg Met
1 5 10 15
Glu Asp Ala Met Pro Glu Asp Asp His Asn Ser Arg Asn Trp Asn Thr
20 25 30
Leu Pro Trp His Arg Gln Trp Leu Val Lys Gln Ala Glu Gly Leu Phe
35 40 45
Asp Phe Phe Gln Tyr Arg Ala Leu Asn Pro Ala Gly Gly Phe Phe Asp
50 55 60
Leu Asp Ala Lys Gly Ala Pro Leu Gln Ala Asn Asp Pro Val Arg Gly
65 70 75 80
Ile His Ala Ser Ala Arg Met Val His Cys Phe Ser Ile Gly His Leu
85 90 95
Leu Gly Arg Pro Gly Cys Gly Asp Ile Val Asp His Gly Met Thr Tyr

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 | |
| Leu Trp Asn Lys His Arg Asp Gly Glu His Gly Gly Tyr Phe Trp Gln | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Val Asn Asp Ala Gly Pro Val Asp Ala Thr Lys Gln Gly Tyr Gly His | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Ala Phe Val Leu Leu Ala Ala Ser Ser Ala Lys Thr Val Gly His Pro | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Leu Ala Asp Arg Met Leu Ala Asp Ile Thr Glu Val Leu Glu Ser Arg | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Phe Trp Glu Glu Lys His Gly Ala Ile Ala Glu Glu Phe Asn Arg Asp | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Trp Ser Pro Ile Asp Asn Tyr Arg Gly Gln Asn Ser Asn Met His Leu | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Thr Glu Ala Leu Met Ala Ala Tyr Glu Val Thr Gly Asp Asn Asn Tyr | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Leu Ser Lys Ala Glu Arg Ile Ala Asp Leu Val Ile Arg Arg Arg Ala | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly Glu Leu Asp Phe Arg Val Pro Glu His Phe Asp Asp Asn Trp Thr | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Leu Asp Lys Asp Tyr Arg Gly Asn Glu Met Phe Arg Pro Ser Gly Ser | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Thr Pro Gly His Trp Leu Glu Trp Ala Arg Leu Ile Leu Gln Leu Trp | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Ile Leu Gly Glu Arg Arg His Asp Trp Met Pro Val Ala Ala Lys Ser | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Phe Val Gln Ser Met Ala Leu Gly Trp Asp Arg Glu Lys Gly Gly | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Phe Phe Tyr Thr Leu Asp Trp Asn Asp Asn Pro Asp Lys Arg Ala Lys | | | |
| 325 | 330 | 335 | |

Leu Trp Trp Pro Met Ser Glu Ala Ala Gly Ala Ala His Phe Leu Asn

340

345

350

Glu Asn Leu Pro Ala Asp Gly Phe Tyr Glu Asp Ser Tyr Arg Arg Ile

355

360

365

Trp Ser Thr Ile Ala Asn Asn Phe Ile Asp His Ala Asn Gly Gly Trp

370

375

380

His Glu Glu Leu Thr Glu Asp Leu Val Pro Ala His Thr Leu Phe Pro

385

390

395

400

Gly Lys Gly Asp Ile Tyr His Ala Leu Gln Ala Cys Leu Ile Pro Leu

405

410

415

Phe Pro Ala Thr Gly Ser Leu Thr Lys Val Ile Lys Glu Ser Gly Gly

420

425

430

Asp Tyr

434

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 3

aaatctagat gacaggttta tacggcaa 28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 4

aaatctagat ggaggacgca atgcccga 28

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 5

aaatctagat gcccgagac gatcaca 28

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 6

aaatctagat gctgccctgg caccgccagt g 31

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 7

aaatctagat gctggtgaaa caggccgagg g 31

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 8

aaatctagat ggtgaaacag gccgaggac t 31

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 9

aaatctagat ggtgcgcggc atccatgcct c 31

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 10

aaatctagat ggtgcattgc ttctccat 28

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 11

aaatctagat gctgctcggc cggccgggct g 31

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 12

aaatctagat gacctatctc tggaacaa 28

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 13

aaatctagat ggtgaacgat gccggcccag t 31

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 14

aaatctagat ggtggacgcc accaagcagg g 31

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 15

aaatctagat ggtgcttctg gccgcctctt c 31

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 16

aaatctagat gctggccgcc tcttccgcca a 31

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 17

aaatctagat gctggccgac cggatgctgg c 31

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 18

aaatctagat gctggctgat attaccga 28

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 19

aaaaagcttt taataatccc cgccgcttt 29

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 20

gccaagcgcg caattaaccc 20

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 21

catgctcgag ctattggccg cagagcgcct 30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 22

aaaggatccc atgcccgaag acgatcacao 30

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 23

cttcggtgac gtgcatatt 19

【図面の簡単な説明】

【図 1】 マンノースの生成を示す HPLC である。

【図 2】 プラスミド pMI 1 4 2 8 の制限酵素地図を示す図である。

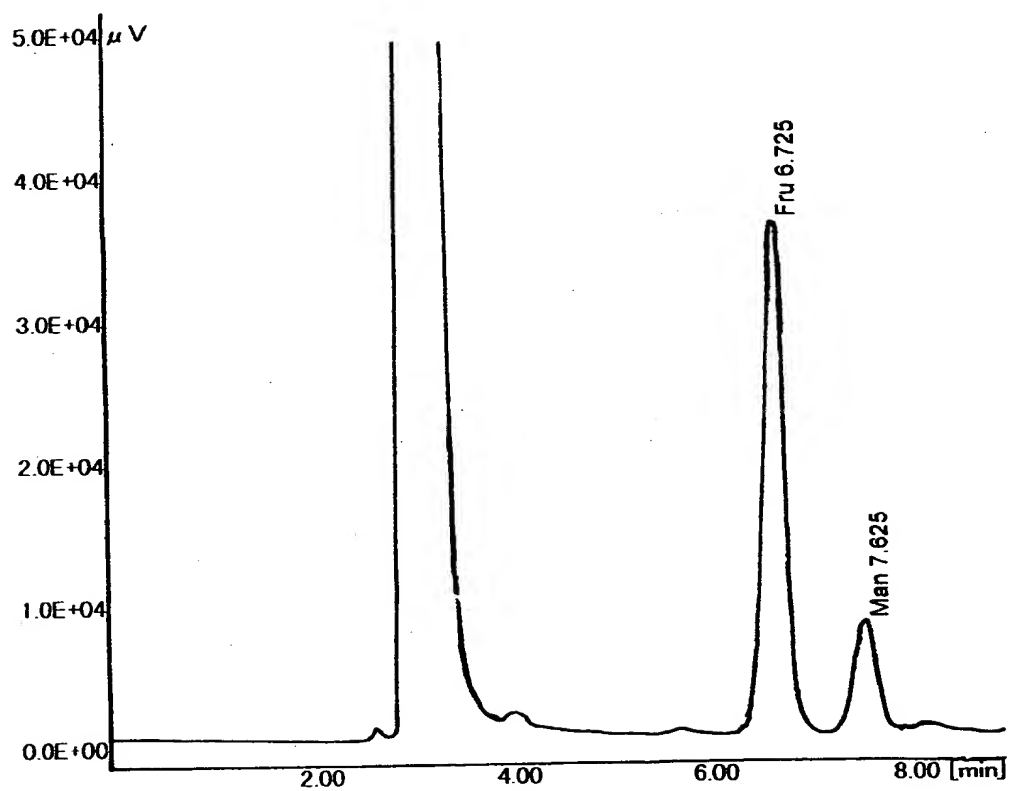
【図 3】 発現ベクター pN 1 C 1 作成の模式図である。

【図 4】 点突然変異体の作成の模式図である。

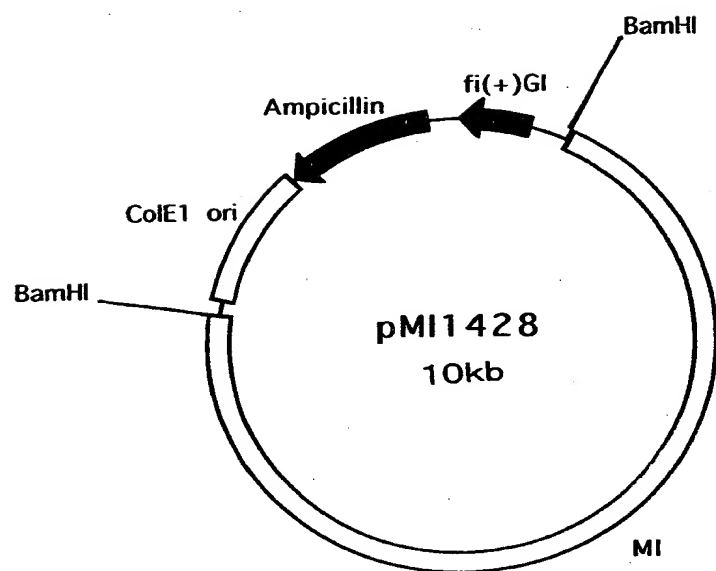
- 【図 5】 点突然変異体の作成の模式図である。
- 【図 6】 点突然変異体の作成の模式図である。
- 【図 7】 点突然変異体の作成の模式図である。

【書類名】 図面

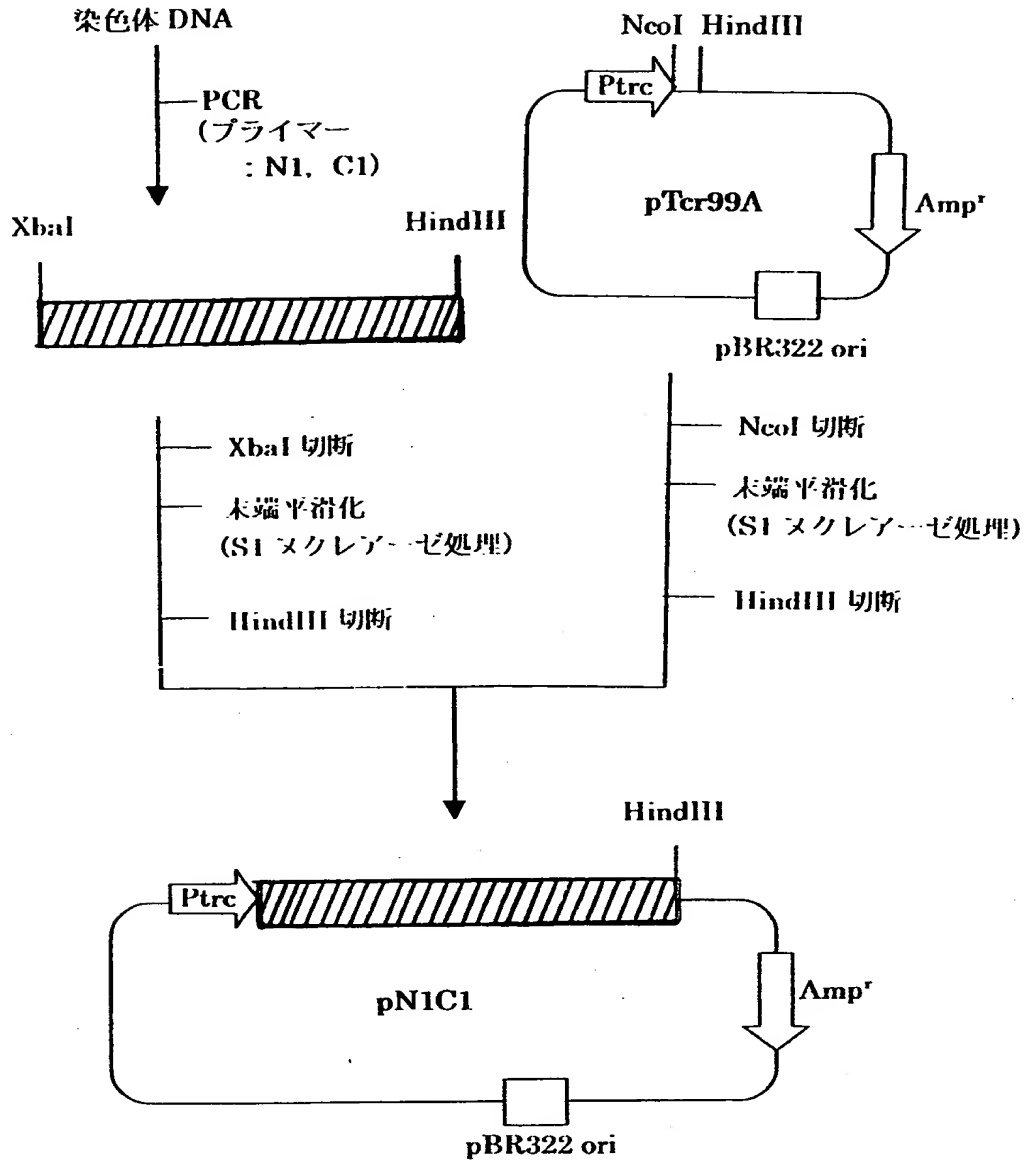
【図 1】



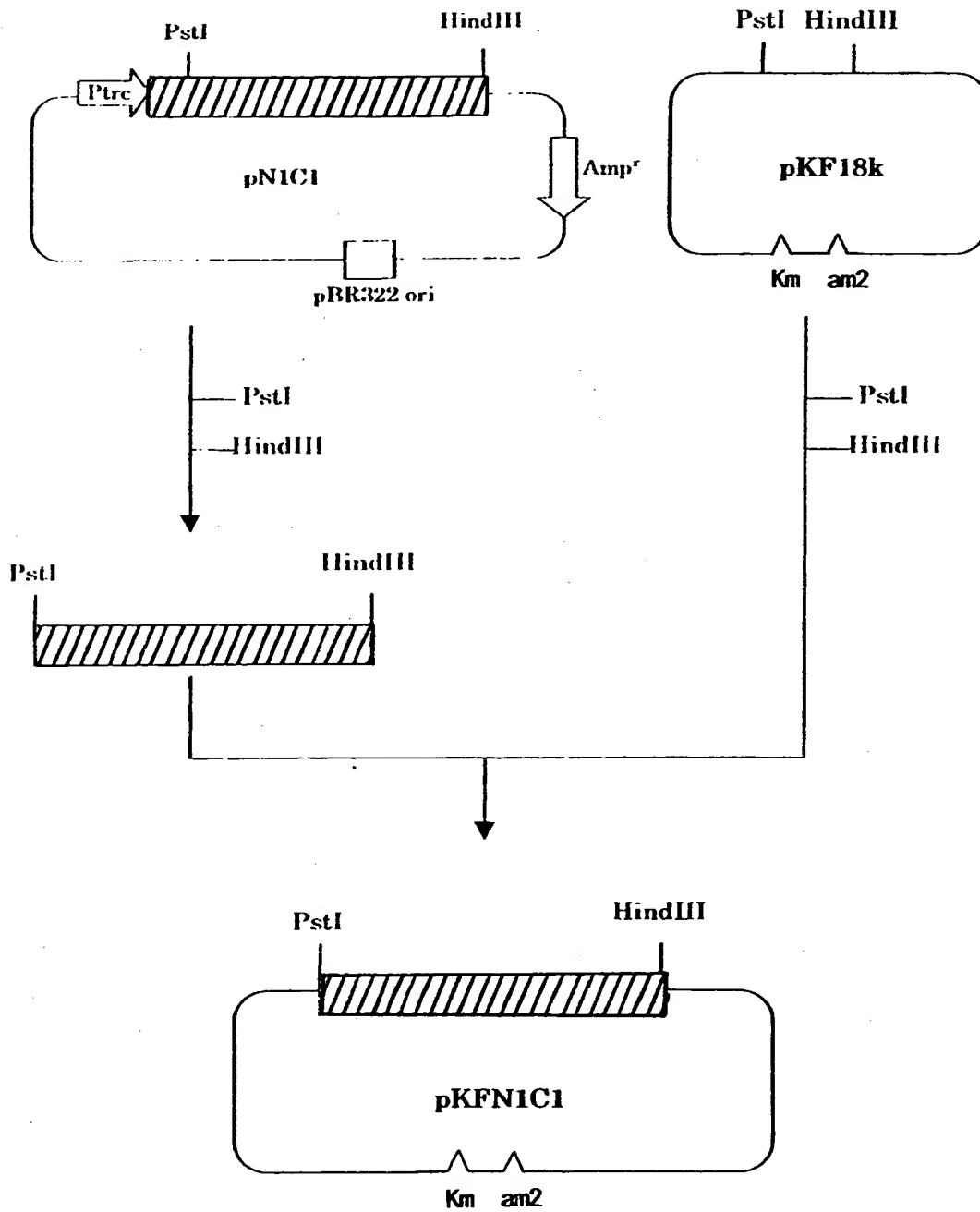
【図 2】



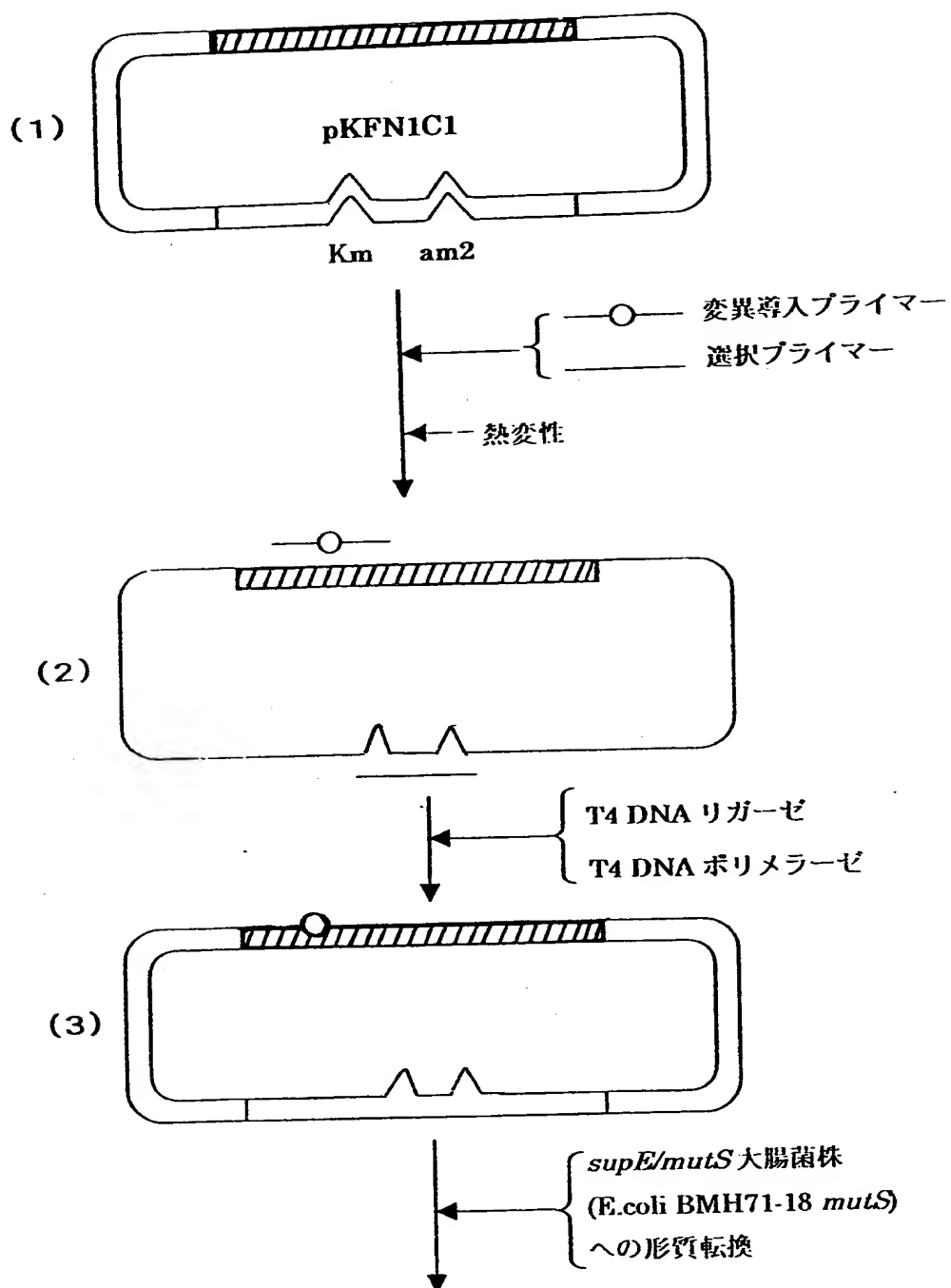
【図 3】



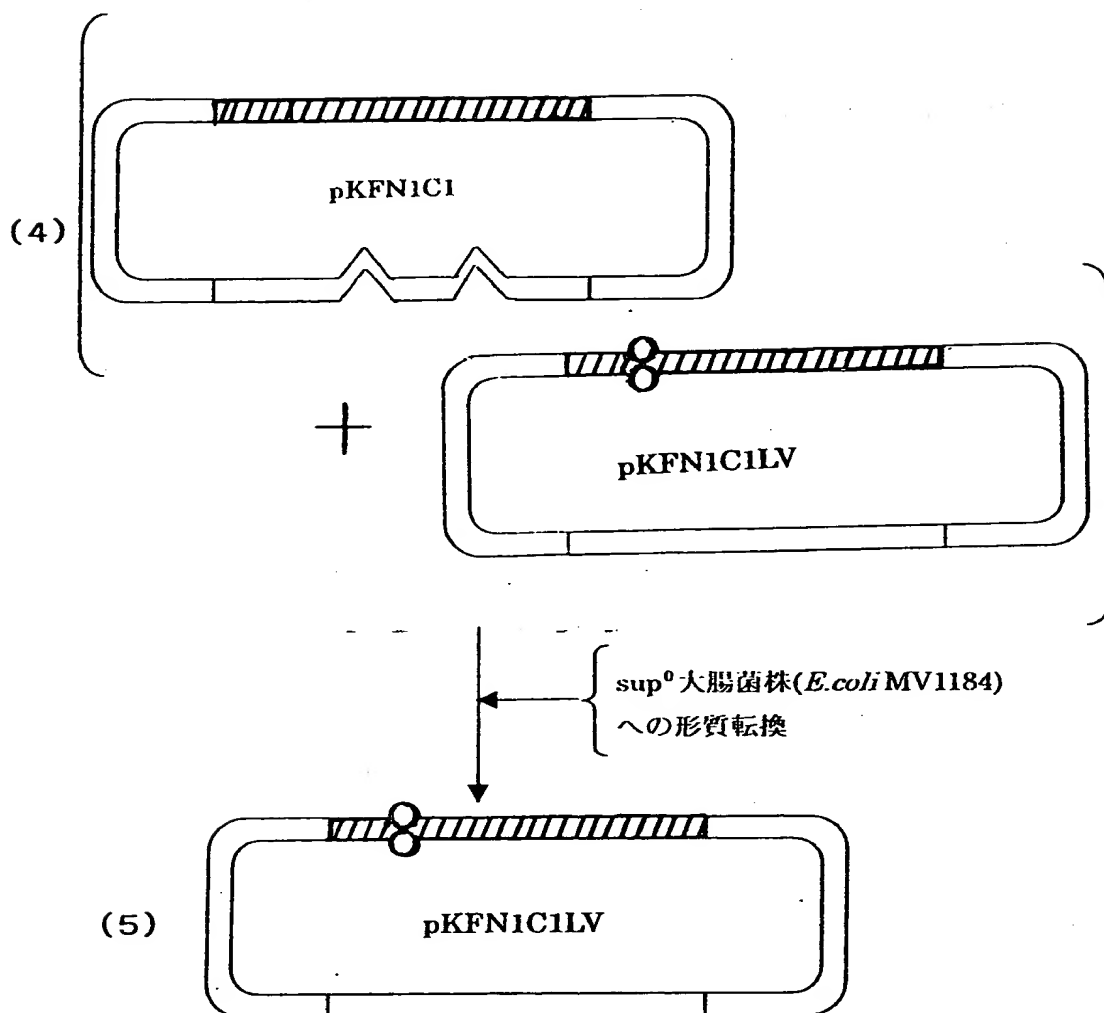
【図 4】



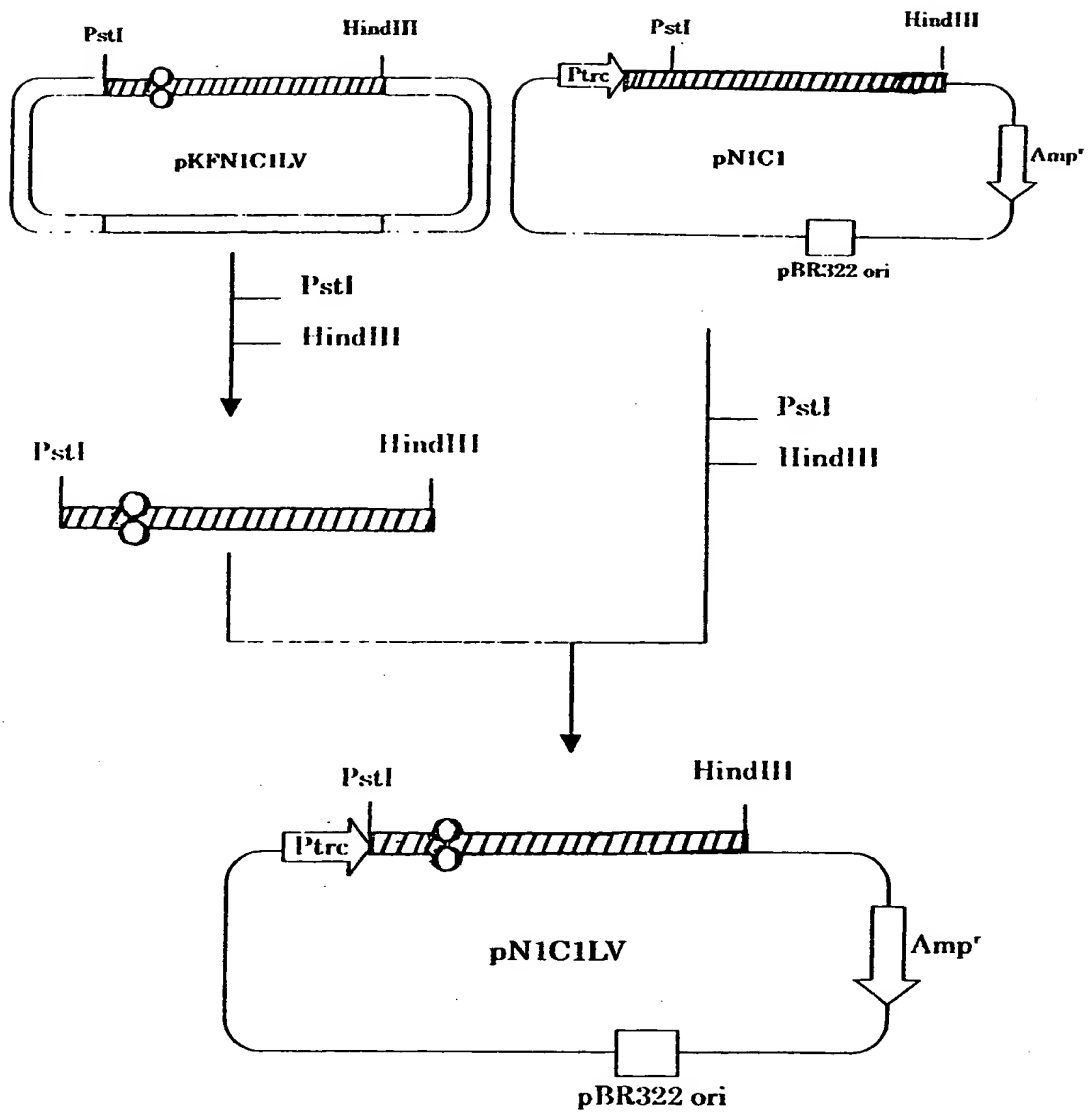
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 耐熱性に優れた新規なマンノースイソメラーゼを提供すること

【解決手段】 配列番号 2 の第 2 0 ～ 4 3 4 番目のアミノ酸配列を有するアグロバクテリウム属微生物由来のポリペプチドは、耐熱性のマンノースイソメラーゼ活性を発現する。さらに、このアミノ酸配列において 1 または 2 以上のアミノ酸が置換され、欠失され、あるいは付加されたアミノ酸配列からなり、マンノースイソメラーゼ活性を発現するポリペプチドが作成される。これらのポリペプチドは、配列番号 1 の DNA 配列を改変することにより、得られる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000187079]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区内神田2丁目2番1号

氏 名 昭和産業株式会社
